

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **09-037785**

(43)Date of publication of application : **10.02.1997**

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12N 9/16  
C12P 19/30  
// (C12N 9/16  
C12R 1:19 )  
(C12N 9/16  
C12R 1:01 )

(21)Application number : **08-094680**

(71)Applicant : **AJINOMOTO CO INC**

(22)Date of filing : **26.03.1996**

(72)Inventor : **MIHARA YASUHIRO  
UDAGAWA TAKASHI  
YAMADA HIDEAKI  
ASANO YASUHISA**

(30)Priority

Priority number : **07149781** Priority date : **25.05.1995** Priority country : **JP**

### (54) PRODUCTION OF NUCLEOSIDE-5'-PHOSPHATE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently obtain the subject compound useful for producing seasonings, medicines and as an intermediate material for these products by making microorganism-derived acid phosphatase act on nucleoside and a donor of phosphoric acid such as polyphosphoric acid under condition of an acidic pH value, and collecting the reaction product.

SOLUTION: This compound is obtained by making acid phosphatase derived from microorganism variants (*Morganella morganii* NCIMB 10466, etc.) which reduce nucleotidase activity act on a nucleoside (e.g. inosine) and phosphoric acid donor (e.g. sodium pyrophosphate), such as a polyphosphoric acid (salt), phenylphosphoric acid (salt), or carbamylphosphoric acid (salt) under condition of pH 3.0-5.5 to form a nucleoside-5'-phosphate (e.g. 5'-inosinic acid); followed by centrifuging the precipitation after stopping the reaction by addition of 2N hydrochloric acid, and separating the product by using, e.g. an adsorptive synthetic resin, thus effectively obtaining the objective compound, nucleoside-5'- phosphate useful for seasonings, medicines and as an intermediate material for seasonings and medicines.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-37785

(43) 公開日 平成9年(1997)2月10日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	P I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
9/16			9/16	B
C 1 2 P 19/30			C 1 2 P 19/30	
// (C 1 2 N 9/16				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-94690	(71) 出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22) 出願日	平成8年(1996)3月26日	(72) 発明者	三原 康博 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平7-149781	(72) 発明者	李多川 隆 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
(32) 優先日	平7(1995)5月25日	(72) 発明者	山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木の本町19-1
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 佐藤 正年 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法

(57) 【要約】

【課題】ヌクレオシドを生化学的に燐酸化することにより、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-リン酸エステルを製造する方法を提供する。

【解決手段】酸性フォスファターゼ、特にヌクレオチダーゼ活性が低下した酸性フォスファターゼを、pH 3.0~5.5 の条件下でヌクレオシド並びにポリ燐酸(塩)、フェニル燐酸(塩)及びカルバミル燐酸(塩)から成る群より選択される燐酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成せしめ、これを採取する。

(2)

特開平9-37785

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物に由来する酸性フォスファターゼをpH 3.0～5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ燐酸（塩）、フェニル燐酸（塩）およびカルバミル燐酸（塩）から成る群より選択される燐酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項2】 酸性フォスファターゼがヌクレオチダーゼ活性を低下させる変異を有する請求項1に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項3】 酸性フォスファターゼがモルガネラ属細菌由来である請求項1に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項4】 酸性フォスファターゼが配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む請求項1に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項5】 酸性フォスファターゼが配列表配列番号4において72番目のグリシン残基及び／又は151番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む請求項2に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項6】 酸性フォスファターゼがエシェリヒア属細菌由来である請求項1に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項7】 酸性フォスファターゼが配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列を含む請求項1に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項8】 酸性フォスファターゼが配列表配列番号11において74番目のグリシン残基及び／又は153番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む請求項2に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項9】 配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基及び／又は151番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む酸性フォスファターゼ。

【請求項10】 配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列を含む酸性フォスファターゼ。

【請求項11】 配列表配列番号11において74番目のグリシン残基及び／又は153番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む酸性フォスファターゼ。

【請求項12】 請求項9～11のいずれかに記載の酸性フォスファターゼをコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項12に記載の遺伝子を含む組換えDNA。

【請求項14】 請求項13に記載の組換えDNAを保有する微生物。

【発明の詳細な説明】

2

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法に関する。また、本発明は、ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造において有用な新規な酸性フォスファターゼ、該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、該組換えDNAを保有する微生物に関する。ヌクレオシド-5'-燐酸エステルは、調味料、医薬並びにそれらの原料等として有用である。

## 【0002】

【従来の技術】ヌクレオシドを生化学的に燐酸化することによりヌクレオシド-5'-燐酸エステルを製造する方法としては、燐酸供与体としてパラニトロフェニル燐酸を用いる方法（特公昭39-29858号）、無機燐酸を用いる方法（特公昭42-1186号）、アセチル燐酸を用いる方法（特開昭56-82998号）、アデノシン三燐酸（ATP）を用いる方法（特開昭63-230094号）が知られている。しかしながら、これらの方法にあっては、使用する基質が高価であったり、反応副生物が生じたりするために、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-燐酸エステルの生産を行うには満足のいくものではなかった。

【0003】そこで、本発明者らは、特定の微生物菌体を酸性条件下でヌクレオシド並びにポリ燐酸（塩）、フェニル燐酸（塩）及びカルバミル燐酸（塩）よりなる群より選択される燐酸供与体に作用させることにより、2'-、3'-ヌクレオチド異性体の副生を伴うことなく、ヌクレオチド-5'-燐酸エステルを効率よく生成する方法を開発した（特開平07-231793号）。

【0004】しかしながら、この方法においても、使用する微生物菌体にわずかながら存在するヌクレオシド分解活性のために反応中に基質が一部分解され、また、反応を継続すると生成蓄積したヌクレオシド-5'-燐酸エステルが分解するため、反応液中に副生物が生成するとともに、十分な収率が得られなかった。さらに、菌体あたりの活性が低いため、高濃度の基質を添加して反応を行えない等の欠点があった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、安価かつ効率的なヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造方法を提供することである。また、本発明の他の目的は、ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造方法において有用な酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA及び該組換えDNAを保有する微生物を提供することである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、従来の方法よりも効率の良いヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造方法を開発するために種々の検討を加えた結果、微生物の無細胞抽出液より精製した酸性フォスファターゼをpH 3.0～5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ燐

(3)

特開平9-37785

3

4

酸（塩）、フェニル燐酸（塩）及びカルバミル燐酸（塩）から成る群より選択される燐酸供与体と作用させることにより、高収率で効率良くヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成することができることを発見した。さらに、モルガネラ属細菌及びエシェリヒア属細菌より酸性フォスファターゼをコードする野生型遺伝子及びヌクレオチダーゼ活性が低下した変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の取得に成功し、遺伝子工学的手法により該遺伝子を大量発現させることによりヌクレオシド-5'-燐酸エステルの生産性が飛躍的に向上することを発見し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、酸性フォスファターゼ、好ましくはヌクレオチダーゼ活性が低下した酸性フォスファターゼをpH 3.0〜5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ燐酸（塩）、フェニル燐酸（塩）及びカルバミル燐酸（塩）から成る群より選択される燐酸供与体と作用させてヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法を提供するものである。

【0008】また、本発明は、モルガネラ属細菌に由来し、ヌクレオチダーゼ活性が低下した変異型酸性フォスファターゼ、該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子\*

モルガネラ・モルガニ (Moranella moranii) NCIMB 10466

モルガネラ・モルガニ (Moranella moranii) IFO 3168

モルガネラ・モルガニ (Moranella moranii) IFO 3848

エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae) JCM 1650

エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae) ATCC 33429

エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae) ATCC 33430

【0012】なお、酸性フォスファターゼ (EC 3.1.3.2) は、本来、燐酸エステルを酸性で加水分解する反応を触媒する酵素であり、燐酸転移反応により生成するヌクレオシド-5'-燐酸エステルを分解するヌクレオチダーゼ活性を有している。本発明のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法においては、このような酸性フォスファターゼでも使用することができるが、高い収率でヌクレオシド-5'-燐酸エステルを得るためには、上記の細菌が産生する野生型の酸性フォスファターゼに比べてヌクレオチダーゼ活性が低下した変異型酸性フォスファターゼを使用することが望ましい。

【0013】上記のような微生物から、酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質を得るには、該活性を有する菌株を適当な培地で培養し、増殖した菌体を回収し、当該菌体を破砕して無細胞抽出液を調製して、これより必要に応じ精製すればよい。

【0014】微生物を培養する培地には格別の制限はなく、通常の炭素源、窒素源、無機イオン及び必要ならば有機栄養源を含む通常の培地でよい。炭素源としては、グルコース、シュクロース等の糖類、グリセロール等のアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウ

\*子、該遺伝子を含む組換えDNA、並びに該組換えDNAを保有する微生物を提供するものである。

【0009】さらに本発明は、エシェリヒア属細菌に由来する新規酸性フォスファターゼ、ヌクレオチダーゼ活性が低下した変異型酸性フォスファターゼ、これら酸性フォスファターゼのいずれかをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、並びに該組換えDNAを保有する微生物を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

<1>酸性フォスファターゼの取得

本発明において使用される酸性フォスファターゼは、微生物に由来するものが好ましく、pH 3.0〜5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ燐酸（塩）、フェニル燐酸（塩）及びカルバミル燐酸（塩）よりなる群より選択される燐酸供与体から燐酸基の転移によりヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成する反応を触媒するものであれば制限はない。特に好適な例として、モルガネラ属又はエシェリヒア属に属する細菌に由来する酵素があり、そのような細菌の代表例として以下のような菌株を挙げることができる。

【0011】

ム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、燐酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオンその他が必要に応じ適宜使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸等、又はこれらを含む酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン分解物、大豆加水分解物等が適宜用いられる。

【0015】培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好気的条件下にてpH 5〜8及び温度25〜40℃の範囲内でpH及び温度を適当に制御しつつ12〜48時間程度培養を行えばよい。

【0016】増殖した菌体は、遠心分離等により培養液から回収することができる。回収した菌体から無細胞抽出液を調製するには、通常の方法が用いられる。すなわち、菌体を超音波処理、ダイノミル、フレンチプレス等の方法にて破砕し、遠心分離により菌体残渣を除去することにより無細胞抽出液が得られる。

【0017】無細胞抽出液から酸性フォスファターゼを精製するには、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル過渡クロマトグラフィー、等電点沈殿等、酵素の精製に通常用いられる手法が適宜組み合わせ

(4)

特開平9-37785

5

て用いられる。精製は、完全精製である必要は必ずしもなく、基質のヌクレオシドの分解に関与する酵素等の夾雑物が除去できればよい。

【0018】<2>酸性フォスファターゼ遺伝子の取得  
酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は当該酵素活性を有する微生物からクローニングすることができる。クローニング方法としては、例えば酵素活性を指標として染色体遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、該蛋白質に対する抗体を作成して染色体遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、精製された蛋白質のN末端等のアミノ酸配列を解析し、これを基にプローブを作成し遺伝子ライブラリーを探索する方法等がある。

【0019】具体的には、上記のモルガネラ・モルガニ又はエシェリヒア・ブラッカエの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子は、それぞれの微生物の染色体遺伝子発現ライブラリーを作成し、フォスファターゼ活性を指標として該ライブラリーを探索することによりクローニングできる。

【0020】すなわち、まず、モルガネラ・モルガニ又はエシェリヒア・ブラッカエより染色体DNAを調製し、これを適当な制限酵素で部分分解した後、エシェリヒア・コリで自律複製できるベクターに連結し、得られた組換えDNAを用いてエシェリヒア・コリを形質転換することにより染色体遺伝子発現ライブラリーが作成できる。染色体DNAを切断するために、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。また、遺伝子のクローニングに使用するベクターとしては、エシェリヒア・コリで自律複製できるベクターであればいかなるものでも構わない。例えば、pUC19、pUC118、pHSG298、pBR322、pBluescriptII等が用いられる。ベクターと、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を連結して組換え体DNAを調製するには、染色体DNAを切断するときに用いる制限酵素と同じもの、又は染色体DNA断片の切断面に相補する切断面を生じる制限酵素を用いてあらかじめベクターを切断し、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いてDNA断片との連結を行えばよい。作成した組換えDNAの受容体としては、ベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えば、HB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が用いられる。

【0021】かくして得られる形質転換体を寒天培地上に生育させコロニーを形成させたのち、培地表面にp-ニトロフェニル燐酸を含む反応液を注ぎ反応を行うと、フォスファターゼ活性を発現した株はp-ニトロフェニルを遊離して黄色を示す。これを指標として、形質転換体を選択することにより目的の酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を保有する形質転換体を選択することができる。

6

【0022】次いで選択された形質転換体より組換えDNAを回収し、ベクターに連結されている酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の構造を解析する。酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の塩基配列は、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の遺伝子の場合、配列表配列番号2に、エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1659 由来の遺伝子の場合、配列表配列番号9にそれぞれ示される。

【0023】<3>変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の取得

上記で得られる酸性フォスファターゼはヌクレオチダーゼ活性を有するため、ヌクレオシド-5'-燐酸エステル製造においては、反応時間の経過とともに生産物の分解を伴い、反応収率を低下させる要因となることがある。このような場合、ヌクレオチダーゼ活性が低下するように酸性フォスファターゼをコードする遺伝子に人為的に変異を起こさせばよい。

【0024】DNAの目的部位に目的の変異を起こす部位特異的変異法としてはPCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press, 1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382, 1987) あるいはファージを用いる方法 (Kramer, W. and Fritts, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 359, 1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367, 1987)などがある。

【0025】ヌクレオチダーゼ活性が低下した酸性フォスファターゼの例としては、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来遺伝子の場合、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基及び/又は151番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換したものが挙げられる。後述の実施例では、72番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に、151番目のイソロイシン残基をスレオニン残基に置換した変異型酸性フォスファターゼの取得例を示した。

【0026】また、エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1659 由来の遺伝子の場合、配列表配列番号11に示されるアミノ酸配列において74番目のグリシン残基及び/又は153番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換したものが挙げられる。後述の実施例では、74番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に、153番目のイソロイシン残基をスレオニン残基に置換した変異型酸性フォスファターゼ取得の例を示した。

【0027】従って、これらの変異型酸性フォスファターゼをコードするように、上記の部位特異的変異法により、野生型遺伝子の特定の部位において塩基の置換を行えばよい。なお、ヌクレオチダーゼ活性を低下させる変異は、ヌクレオシド-5'-燐酸の生成活性が実質的に低下しない変異であることが望ましく、ヌクレオチダーゼ活性の低下の程度としては、野生型酵素の10ないし40%程度まで活性が低下すればよい。

(5)

特開平9-37785

7

【0028】<4>酸性フォスファターゼ遺伝子の宿主への導入

上記のようにして得られる酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片は、適当なベクターに再度組換えて宿主細胞に導入させることにより、酸性フォスファターゼ活性を高レベルに発現した組換え菌を得ることができる。宿主としては、上記したHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が挙げられるが、これ以外にも、構築した組換えDNAの複製起点と酸性フォスファターゼ遺伝子が機能し、組換えDNAが複製可能でかつ酸性フォスファターゼ遺伝子の発現が可能な細菌ならば、全て宿主として利用できる。最も好ましい宿主の1つはエシェリヒア・コリ JM109である。

【0029】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を組み込むベクターとしては、宿主において複製可能なものであれば特に制限はない。例えば宿主としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、当該細菌で自立複製できるプラスミドを挙げることができる。

【0030】例えば ColE1系プラスミド、p15A系プラスミド、R因子系プラスミド、ファージ系プラスミド等を用いることができる。具体的に例示すれば、pBR322 (Gene, 2, 95, 1977), pUC19 (Gene, 33, 103, 1985), pUC19 (Methods in Enzymology, 153, 3, 1987), pACYC184 (J. Bacteriol., 134, 1141, 1978), pSC101 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3240, 1973)等が挙げられる。

【0031】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとを連結させてなる組換えDNAを宿主に導入する方法としては特に制限はなく、通常の方法により行うことができる。宿主としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法 (J. Mol. Biol., 53, 159, 1970), Hanahan法 (J. Mol. Biol., 166, 557, 1983), S.E.M法 (Gene, 96, 23, 1990, Chungらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2172, 1989), 電気穿孔法 (Nucleic Acids Res., 16, 6127, 1988)などの方法を用いることができる。

【0032】また、上記のように、酸性フォスファターゼ遺伝子を自律複製可能なベクターDNAに挿入したものを宿主に導入し、染色体外DNAとして宿主に保持させてもよいが、酸性フォスファターゼ遺伝子を、トランスダクション、トランスポゾン (Biotechnol., 1, 417, 1983), Muファージ (特開平2-109985号) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab., 1972)を用いた方法で宿主微生物の染色体に組み込んでよい。

【0033】<5>組換え菌による酸性フォスファターゼ遺伝子の発現とヌクレオシド-5'-燐酸の製造  
上記のようにして得られる酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含む組換えDNAを導入した形質転換体

8

は、炭素源、窒素源、無機イオン等に必要ならば有機炭素源を含む適当な培地で培養することにより酸性フォスファターゼ活性を高レベルに菌体内に発現することができる。炭素源としては、グルコース等の炭水化物、グリセロール等のアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、燐酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、その他が必要に応じて適宜使用される。有機炭素源としては、ビタミン、アミノ酸等、及びこれらを含む酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン分解物、大豆加水分解物、その他が適宜用いられる。また、培地にIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)等の発現誘導剤を添加することにより、酸性フォスファターゼ活性の発現量が増加する場合がある。

【0034】培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好気的条件下にてpH5~8及び温度25~40℃の範囲内でpH及び温度を適当に制御しつつ12~48時間程度培養を行えばよい。

【0035】次いで培養物から菌体を回収し、破砕により細胞抽出液を取得し、これから酸性フォスファターゼを精製することができる。精製には上記<1>に述べたような酵素の精製に通常用いられる手法が適宜組み合わせられて用いられる。精製は必ずしも完全精製である必要はなく、基質のヌクレオシドの分解に関与する酵素等の夾雑物が除去できればよい。上記<1>で取得した酸性フォスファターゼ又はかくして遺伝子工学的手法により遺伝子を大量発現させて得られる酸性フォスファターゼを、ヌクレオシド並びにポリ燐酸(塩)、フェニル燐酸(塩)及びカルバミル燐酸(塩)よりなる群より選択された燐酸供与体と接触反応させることにより、反応液中にヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成可能である。

【0036】この際、高い生産性を得るには、反応液のpHを3.0~5.5の範囲の弱酸性に調整することが重要である。また、遺伝子工学的手法により酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を大量発現させた場合、特にヌクレオチダーゼ活性が低下した変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を大量発現させた場合には、精製した酸性フォスファターゼに替えて、形質転換体の菌体を含む培養物、該培養物から分離・回収した菌体、該菌体を固定化処理、アセトン処理、凍結乾燥処理等した菌体処理物を使用することによっても安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成することができる。

【0037】使用するヌクレオシドとしては、プリンヌクレオシド類として、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサンチン、プリンリボシド、6-メトキシブリ

(5)

特開平9-37785

9

10

ンリボシド、2、6-ジアミノプリンリボシド、6-フルオロプリンリボシド、6-チオプリンリボシド、2-アミノ-6-チオプリンリボシド、メルカプトグアノシン等、ピリミジンヌクレオシド類として、ウリジン、シトシン、5-アミノウリジン、5-ヒドロキシウリジン、5-ブロモウリジン、6-アザウリジン等が挙げられる。反応によりこれらの天然型ヌクレオシド及び非天然型ヌクレオシドの5'位が特異的にリン酸化され、それぞれ対応するヌクレオシド-5'-リン酸エステルが生成する。

【0038】反応液に添加するヌクレオシドの濃度は1~20 $\mu$ mol/Lが望ましい。水に難溶性のヌクレオシドを使用する場合には、界面活性剤あるいはジメチルスルホキシドのような界面活性剤を添加すると反応率が向上する場合がある。

【0039】リン酸供与体として用いられるポリリン酸(塩)としては、ピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸、又はそれらの混合物、もしくはそれらのナトリウム塩、カリウム塩、またはそれらの塩混合物などが、フェニルリン酸(塩)としては、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O、O-ジフェニル酸無水物、又はそれらの混合物などが、カルバミルリン酸(塩)としては、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウム、又はそれらの混合物などが使用可能である。リン酸供与体の使用濃度は、リン酸受容体であるヌクレオシドの濃度によって決定される。通常、ヌクレオシドの1~5倍量が望ましい。反応は、通常、温度20~50℃、好ましくは30~40℃で、pH 3.5~6.5、好ましくはpH 4.0~5.0の弱酸性側が好結果を与える。反応には静置又は攪拌のいずれの方法も採用し得る。反応時間は、使用する酵素の活性、基質濃度などの条件によって異なるが、1~100時間である。

【0040】このようにして生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルを反応終了混合物より採取分離するには、合成吸着樹脂を用いる方法や沈殿剤を用いる方法、その他通常の採取分離方法が採用できる。

【0041】

【実施例】以下、実施例にて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、本実施例において、原料のヌクレオシド及び生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、下記の条件にて分析した。

【0042】カラム: Cosmosil SC18-AR (4.6 $\times$ 150mm) (ナカライテスク社製品)

移動相: 5mM リン酸バッファー (pH2.8)/メタノール=95/5

流速: 1.0 mL/min

温度: 室温

検出: UV 245 nm

【0043】また、リン酸転移活性の測定は次の条件で行った。イノシン40 $\mu$ mol/L、ピロリン酸ナトリウム100 $\mu$ mol/L、酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)100 $\mu$ mol/L及び酵素を含む反応液(1 mL)でpH 5.0、30℃で10分反応を行った。2 N塩酸200 $\mu$ Lを添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除去、リン酸転移反応により生成した5'-イノシン酸を上記の条件で定置した。この標準反応条件にて1分間に1 $\mu$ molのイノシン酸を生成する酵素量を1 unitと定めた。

【0044】また、酸性フォスファターゼ活性の測定は次の条件で行った。5'-イノシン酸15 $\mu$ mol/L、メス/NaCl緩衝液(pH5.0)100 $\mu$ mol/Lおよび酵素を含む反応液(1 mL)で30℃で10分反応を行った。2 N塩酸200 $\mu$ Lを添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除去、加水分解反応により生成したイノシンを上記の条件で定置した。この標準反応条件にて1分間に1 $\mu$ molのイノシンを生成する酵素量を1 unitと定めた。

【0045】実施例1 (モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼの精製と性質)

ペプトン1 g/dL、酵母エキス0.5 g/dL及び食塩1 g/dLを含有する栄養培地(pH7.0)50 mLを500 mL坂口フラスコに入れ、120℃にて20分間加熱殺菌した。これに斜面培養したモルガネラ・モルガニ NCIMB 10465を白金耳接種し、30℃で16時間振盪培養した。培養液から遠心分離で回収した菌体約3,000gを1 Lの100mMリン酸バッファー(pH7.0)に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行って菌体を破砕した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0046】この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈澱を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈澱を遠心分離で集め、100mM リン酸バッファーに溶解した。

【0047】この粗酵素液を100mM リン酸バッファー(pH7.0)5 Lに対し4回透析した後、20mMリン酸バッファー(pH7.0)で平衡化したDEAE-トヨパール 650M カラム(口径 $\phi$ 4.1 $\times$ 長さ22cm)にチャージし、800mLの20mMリン酸バッファー(pH7.0)で洗浄した。酵素活性は、素通り画分にあったので、当該画分を回収した。

【0048】この活性画分に、35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、35%硫酸飽和の20mMリン酸バッファー(pH7.0)で平衡化したブチルトヨパールカラム(口径 $\phi$ 3.1 $\times$ 長さ25cm)に吸着させた。35%飽和から20%飽和リン酸バッファー(pH7.0)の直線的な濃度勾配で溶出した。

【0049】活性画分を集め、50mMリン酸バッファー(pH7.0)1 Lに対し透析した後、50mMリン酸バッファー(pH7.0)で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(口径 $\phi$ 5



(7)

特開平9-37785

11

×長さ6.5cm)に吸着させた。50mMから300mM 磷酸バッファ (pH7.0)の直線的な濃度勾配で溶出した。

【0050】活性画分を集め、限外ろ過により濃縮した。この酵素液をHiLoadTM 16/60 Superdex 200 カラム (ファルマシア社製品)に注入し、100mM 食塩を含む50mM磷酸バッファ (pH7.0)により流速1.0mL/分にて溶出した。

\*

12

\*【0051】以上の操作によって、磷酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約10%の回収率で約550倍に精製した。この精製過程における比活性及び回収率を表1に示す。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

【0052】

【表1】

工 程	活性 (unit)	総蛋白 (mg)	比活性 (unit/mg)	回収率 (%)
1. 無細胞抽出液	587	127,200	0.005	100
2. 硫酸分画 (80~60%)	558	122,210	0.005	95
3. DEAE-トヨパール	517	36,488	0.014	87
4. プチルトヨパール	394	1,121	0.351	66
5. ヒドロキシアパタイト	112	50	2.244	19
6. Superdex200	63	24	2.630	10

【0053】精製された酵素は次の性質を有していた。

(1) 作用: ポリ磷酸等の磷酸供与体よりヌクレオシドに磷酸を転移し、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成する。逆に磷酸エステルを加水分解する作用も示す。

(2) 基質特異性: 磷酸転移反応においては、ピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸、フェニル磷酸ジナトリウム、フェニル磷酸ジカリウム、O、O'-ジフェニル酸無水物、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウムなどが磷酸供与体となる。また、磷酸受容体としてはプリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサンチン、ウリジン、シトシン等が磷酸受容体となる。一方、磷酸エステル加水分解反応においては、ピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸等の無機磷酸、また、ジナトリウムフェニル磷酸ジカリウム、O、O'-ジフェニル酸無水物、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウム等の磷酸エステル、さらに、5'-プリンリボチド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサンチル酸、5'-ウリシル酸、5'-シチシル酸等の5'-ヌクレオチドが作用を受ける。

(3) 至適pH: 5.2 (磷酸転移反応)、6.5 (磷酸エステル加水分解反応)

(4) pH安定性: pH 3.5~12.0 (30℃、60分処理)

(5) 至適温度: 35℃付近

(6) 温度安定性: 30℃まで安定 (pH 7.0、30分処理)

(7) 金属イオン及び阻害剤の影響: 本酵素活性は金属イオン添加による活性化現象は見られず、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 及び $\text{Cu}^{2+}$ によって阻害される。また、ヨード酢酸によって阻害される。

(8) 分子量: 高速液体クロマトグラフィー (TSKgel G 50

-3000SW、東ソー社製品)により約190,000と算出される。

(9) サブユニット分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約25,000と算出される。

20 【0054】本酵素はヌクレオシドへの磷酸転移活性だけでなく、逆に磷酸エステルを加水分解する活性も示し、しかも磷酸エステル分解活性のほうが磷酸転移活性に比べて20倍以上高い活性を示した。また、その他の性質もモルガネラ菌の菌が産生する既知の酸性フォスファターゼとよく一致することから (Microbiology, 149, 1341-1350 (1994))、本酵素は酸性フォスファターゼであることが明らかとなった。

30 【0055】ピロ磷酸ナトリウム10q/dl及びイノシン2q/dlをpH 5.5、5.0、4.5、4.0、3.5の各pHの酢酸バッファに溶解し、これに上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加した。各pHを維持しながら30℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は、5'-イノシン酸のみで、2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図1に示す。図1中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度(mq/dl)を、横軸は反応時間(hr)を、また白抜き正方形はpH 5.5、黒塗り三角形はpH 5.0、白抜き三角形はpH 4.5、黒塗り円形はpH 4.0、白抜き円形はpH 3.5における反応の推移を示す。5'-イノシン酸の生成速度はpH5.0の時に最大となったが、5'-イノシン酸の最大蓄積量はpHがより低い方が高くなった。5'-イノシン酸の生産にはpH4.0の反応条件が最も効率がよく、3時間の反応で2.60q/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

40 【0056】実施例2 (モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ標品によるヌクレオシドの磷酸化反応)

ピロ磷酸ナトリウム10q/dl及び磷酸受容体としてイノシン、グアニン、ウリジン又はシチジン2q/dlを酢酸バッファ (pH4.0)に溶解し、これに実施例1の酵素標品を

(8)

特開平9-37785

13

50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30℃で3時間反応させた。反応により生成したヌクレオシド-5'-エステルの量を表2に示す。なお、生成したヌクレオシドはヌクレオシド-5'-エステルのみでヌクレオシド-2'-エステル及びヌクレオシド-3'-エステルの副生は全く認められなかった。

【0057】

【表2】

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	2.60
グアノシン	5'-グアノシル酸	1.90
ウリジン	5'-ウリジル酸	1.30
シトシン	5'-シチジル酸	0.90

【0058】実施例3（モルガネラ・モルガニ由来の酵素）

燐酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dl)
トリポリ燐酸ナトリウム	2.10
ポリ燐酸ナトリウム	2.72
フェニル酢酸ジナトリウム	2.33
カルバミル燐酸ジナトリウム	2.54

【0060】実施例4（エシェリヒア・ブラッカエ由来の酸性フォスファターゼの精製と性質）

ペプトン1g/dl、酵母エキス0.5g/dl及び食塩1g/dlを含有する栄養培地（pH7.0）50mLを500mLの坂口フラスコに入れ、120℃にて20分間加熱殺菌した。これに、斜面培養したエシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650 を一白金耳接種し、30℃で18時間振盪培養した。培養液から遠心分離により菌体を回収した。この菌体約3,300gを1Lの100mM 燐酸バッファー（pH7.0）に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破砕した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0061】この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈殿を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈殿を遠心分離により回収し、100mM 燐酸バッファーに溶解した。

【0062】この粗酵素液を100mM 燐酸バッファー（pH7.0）5Lに対して4回透析したのち、20mM燐酸バッファー（pH7.0）で平衡化したDEAE-トヨパール65CMカラム（口径φ6.2×長さ35cm）にチャージし、20mM燐酸バッファー（pH7.0）で洗浄した。酵素活性は素通り画分にあったので、当該画分を回収した。

【0063】この活性画分に35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、これを35%飽和硫酸アンモニウ

14

\* 性フォスファターゼ標品による5'-イノシン酸の生産）

イノシン2g/dlおよび燐酸供与体としてトリポリ燐酸ナトリウム、ポリ燐酸ナトリウム（商品名：ポリゴンP、千代田化学（株）製品）、フェニル酢酸ジナトリウム又はカルバミル燐酸ジナトリウム10g/dlを酢酸バッファー（pH4.0）に溶解し、これに実施例1で調製した酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら30℃で3時間反応させた。反応により生成した5'-イノシン酸の量を表3に示す。いずれの燐酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ燐酸ナトリウムを燐酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0059】

【表3】

ムを含む20mM燐酸バッファー（pH7.0）で平衡化したブチルトヨパールカラム（口径φ5.0×長さ22.5cm）に吸着させた。これを35%飽和から20%飽和燐酸バッファー（pH7.0）の直線的な濃度勾配で溶出した。

【0064】活性画分を集め、100mM 燐酸バッファー（pH7.0）1Lに対して透析したのち、100mM 燐酸バッファー（pH7.0）で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム（口径φ3.0×長さ7.0cm）に吸着させた。これを50mMから100mM 燐酸バッファー（pH7.0）の直線的な濃度勾配で溶出し、活性画分を集めた。

【0065】この酵素液を10mM燐酸バッファー（pH5.0）1Lに対し透析した後、10mM燐酸バッファー（pH5.0）で平衡化したQH-Tovoperalカラム（口径φ2.0×長さ14.0cm）に吸着させた。これを0mMから300mM塩化カリウムを含む燐酸バッファー（pH5.0）の直線的な濃度勾配で溶出した。この活性画分を集めた。

【0066】以上の操作によって、燐酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約16%の回収率で約600倍に精製した。この精製過程における比活性及び回収率を表4に示す。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

【0067】

【表4】

(9)

特開平9-37785

15

16

工 程	総活性 (unit)	総蛋白 (mg)	比活性 (unit/mg)	回収率 (%)
1. 無細胞抽出液	365	160,650	0.002	100
2. 硫酸分画 (30~60%)	340	138,895	0.002	93
3. DEAE-トヨパール	318	30,430	0.010	87
4. プチルトヨパール	232	661	0.347	53
5. ヒドロキシアパタイト	96	96	1.000	26
6. Superdex200	59	43	1.365	16

【0068】精製された酵素は次の性質を有していた。

(1) 作用：ポリリン酸等のリン酸供与体よりヌクレオシドにリン酸を乾移し、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する。逆にリン酸エステルを加水分解する作用も示す。

(2) 基質特異性：リン酸転移反応においては、ヒロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O、O-ジフェニル酸無水物、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウムなどがリン酸供与体となる。また、リン酸受容体としてはプリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサンチンウリジン、シトシン等がリン酸受容体となる。一方、リン酸エステル加水分解反応においては、ヒロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸等の無機リン酸、また、ジナトリウムフェニルリン酸ジカリウム、O、O-ジフェニル酸無水物、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウム等のリン酸エステル、そして5'-プリンリボシド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサンチル酸、5'-ウリジル酸、5'-シチジル酸等の5'-ヌクレオチドが作用を受ける。

(3) 至適pH：5.2（リン酸転移反応）、6.5（リン酸エステル加水分解反応）

(4) pH安定性：pH 3.5~12.0（35℃、60分処理）

(5) 至適温度：35℃付近

(6) 温度安定性：40℃まで安定（pH 7.0、30分処理）

(7) 金属イオン及び阻害剤の影響：本酵素活性は金属イオン添加による活性化現象は見られず、Fe<sup>2+</sup>、Ad<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>およびCu<sup>2+</sup>によって阻害される。また、ヨード酢酸によって阻害される。

(8) 分子重：高速液体クロマトグラフィー（TSKgel G-3000SW、京ソーテック製品）により約188,000と算出される。

(9) サブユニット分子重：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約24,500と算出される。

【0069】本酵素もモルガネラ・モルガニ NCIM 10466の無細胞抽出液より精製した酵素と同様にヌクレオシドへのリン酸乾移活性だけでなく、逆にリン酸エステルを加水分解する活性も示した。しかもリン酸エステル分解活性のほうがリン酸乾移活性に比べて30倍以上高い活性を示す

ことから、酸性フォスファターゼであることが明らかとなった。

【0070】ヒロリン酸ナトリウム15q/dlおよびイノシン3q/dlをpH 5.5、5.0、4.5、4.0、3.5の各pHの酢酸バッファーに溶解し、これに上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加した。各pHを維持しながら35℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで、2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図2に示す。

【0071】図2中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度(mq/dl)を、横軸は反応時間(hr)を、また白抜き正方形はpH 5.5、黒塗り三角形はpH 5.0、白抜き三角形はpH 4.5、黒塗り円形はpH 4.0、白抜き円形はpH 3.5における反応の推移を示す。5'-イノシン酸の生成速度はpH 5.0の時に最大となったが、5'-イノシン酸の最大蓄積量はpHがより低い範囲の方が高く、5'-イノシン酸の生産はpH 4.0の反応条件が最も効率的であった。30℃、pH 4.0の反応では3時間で1.56q/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

【0072】実施例5（エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼ標品によるヌクレオシドのリン酸化反応）

ヒロリン酸ナトリウム15q/dl及びイノシン、グアニン、ウリジン又はシチジンを3q/dlを酢酸バッファー（pH 4.0）に溶解し、これに実施例4の酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で3時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-エステルを表5に示す。なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-エステルのみでヌクレオシド-2'-エステル及びヌクレオシド-3'-エステルの副生は全く認められなかった。

【0073】

【表5】

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	1.56
グアニン	5'-グアニル酸	1.05
ウリジン	5'-ウリジル酸	1.87
シチン	5'-シチジル酸	1.22

【0074】実施例6（エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼ標品による5'-イノシン酸の生産）

(10)

特開平9-37785

17

イノシン2 q/dL及び燐酸供与体としてトリポリ燐酸ナトリウム、ポリ燐酸ナトリウム（商品名：ポリゴンP、千代田化学（株）製品）、フェニル酢酸ジナトリウムまたはカルバミル燐酸ジナトリウム10q/dLを酢酸バッファ（pH4.0）に溶解し、これに実施例4で調製した酵素標品を上記の酵素標品を50units/dLとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で3時間反応させた。生成\*

18

\*した5'-イノシン酸の量を表6に示す。いずれの燐酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ燐酸ナトリウムを燐酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0075】

【表6】

燐酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dL)
トリポリ燐酸ナトリウム	1.20
ポリ燐酸ナトリウム	1.78
フェニル酢酸ジナトリウム	1.50
カルバミル燐酸ジナトリウム	1.83

【0076】実施例7（モルガネラ・モルガン染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離）

【0077】（1）N末端アミノ酸配列の決定

モルガネラ・モルガン NCIMB 10466の無細胞抽出液から実施例1記載の方法に従い精製した酸性フォスファターゼをD1TCメンブレン（Milligen/Bioscience社製）に吸着させ、Prosequencer 6625（Milligen/Bioscience社製）を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。配列表配列番号1に示した20残基のN末端アミノ酸配列が決定された。

【0078】（2）酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の単離

モルガネラ・モルガン NCIMB 10466の培養菌体からMurray and Thomsonの方法（Nucl. Acid Res., 4321, 8, 1980）に従い、染色体DNAを調製した。これを制限酵素 Sau3AⅠで部分分解した後、シタビ密度勾配遠心分離により3～6 kbpのDNA断片を分画した。プラスミドベクターpUC118（宝酒造社製）を制限酵素 BanHⅠで切断し、部分分解した染色体DNA断片と連結させた。DNAの連結はDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用い、指定された方法にて行った。次いで、得られたDNA混合物を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造社製）を形質転換した。形質転換体をアンピシリン100 μg/mLを含むL寒天培地上にプレーティングして生育させ、遺伝子ライブラリーを作成した形質転換体の生育した寒天培地の表面に4 mM p-ニトロフェニル燐酸及び100mM メス/NaCH<sub>3</sub>COO（pH 6.5）を含む反応液を注ぎ、30℃で15分間保温した。フォスファターゼ活性を発現した菌は、p-ニトロフェノールを遊離して黄色を示すため、これを指標として形質転換体を選択した。約20,000株の形質転換体の遺伝子発現ライブラリーを探索した結果、フォスファターゼ活性を発現した形質転換体30株が得られた。

【0079】フォスファターゼ活性を発現した30株の形質転換体を単コロニー分離し、アンピシリン100 μg/mLを含むL培地2.5mLに接種し、37℃で16時間培養した。培養液より集菌した菌体にイノシン2 q/dL及びピロ燐酸

ナトリウム10q/dLを含む100mM 酢酸ナトリウムバッファ（pH5.0）50μLを添加し、30℃で16時間反応を行った。

【0080】HPLC分析により5'-イノシン酸の生成を検出し、燐酸転移活性を持つ菌株を選択した。その結果、燐酸転移活性を示し、目的の酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体5株を得ることができた。

【0081】実施例8（モルガネラ・モルガン NCIMB 10466由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列の決定）

実施例7で得られたモルガネラ・モルガン NCIMB10466由来の酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法（Molecular Cloning 2nd edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p1.25, 1989）によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。なお、このプラスミドはpMPI501と命名された。決定した挿入DNA断片の制限酵素地図を図3に示す。

【0082】さらにサブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素 HindⅢと制限酵素 EcoRⅠで切り出される1.2kbpの大きさの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のために、この1.2kbpの断片を HindⅢ及び EcoRⅠで切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。pMPI505と命名されたこのプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造株式会社製）を形質転換し、これを100 μg/mLのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

【0083】pMPI505を保有するエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造製）の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（アブライバイオケミカル社製）を用い、サ

(11)

特開平9-37785

19

29

ンガーらの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161, 1980)に従って行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号2に示した。また、この塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号3に示した。このアミノ酸配列中に精製酵素のN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した。精製酵素のN末端は配列表番号3に示される配列の21番目のアラニン残基から開始していたため、1番目のメチオニン残基から20番目のアラニン残基までのペプチドは、翻訳後に除去されるものと考えられた。これより推定される成熟蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号4に示した。

【0084】アミノ酸配列から予想される成熟蛋白質の分子量は24.9キロダルトンと算出され、精製酵素のSDS-PAGEの結果とよく一致した。以上の結果及び本断片を含むプラスミドを有する形質転換体が燐酸転移活性を示すことから本オープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼをコードする領域であると同定した。

【0085】塩基配列、アミノ酸配列等々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号2に示される塩基配列は、既知のモルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子 (Thaller, M. C. et. al. Microbiology, 140, 1341, 1994) では、54番目のGがA、72番目のGがA、276番目のTがG、378番目のTがC、420番目のGがT、525番目のCがG、529番目のCがT、531番目のGがAである以外は配列が一致した。また、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列は、モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼと同一であることが判明した。すなわち、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10456の酸性フォスファターゼ遺伝子である。\*

\*【0086】なお、前駆体蛋白質は249個のアミノ酸から成り、その配列から予想される蛋白質の分子量は27.0キロダルトンであった。

【0087】また、pMPT505をエシェリヒア・コリ JM109に保持させた株はAJ13143と命名され、この株は、ブタベスト条約に基づく国際寄託機関である日本国茨城県に所在の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に1995年2月23日付で既に寄託されており、その受託番号FERM BP-542が付与されている。

10 【0088】実施例9 (モルガネラ・モルガニ NCIMB 10456由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の発現による活性の増幅)

実施例8にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pMPT505をアンピシリン100 µg/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50mLに接種し、37°Cで16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生塩食塩水で1回洗浄した。菌体を5 mLの100mM 燐酸バッファー (pH7.0)に懸濁し、4°Cで25分間超音波処理を行い破砕した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0089】得られた無細胞抽出液の燐酸転移活性を、プラスミドpUC118と同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109及びモルガネラ・モルガニ野生株より調製した無細胞抽出液の活性を対照として測定した結果を表7に示す。エシェリヒア・コリ JM109/pUC118では燐酸転移活性は検出されず、モルガネラ・モルガニ野生株でも燐酸転移活性は低かった。一方、エシェリヒア・コリ JM109/pMPT505はモルガネラ・モルガニ野生株に比べて比活性で150倍と高い燐酸転移活性を示しており、この結果から導入したDNA断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

【0090】

【表7】

菌株	酵素活性 (units/mg)
モルガネラ・モルガニ NCIMB10456	0.008
エシェリヒア・コリ JM109/pUC118	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pMPT505	1.250

【0091】実施例10 (モルガネラ・モルガニ NCIMB 10456由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産)

ピロ燐酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6g/dlを100mM 酢酸バッファー (pH4.0)に溶解し、これに上記のエシェリヒア・コリ JM109/pMPT505の菌体を乾燥菌体重で150 mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30°Cで6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図4

40 に示す。図4中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度(mg/dl)を、横軸は反応時間(hr)を、また黒埋め円形は反応の推移を示す。酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は着目の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロ燐酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては非常に効率よく短時間で5'-イノシン酸が生成蓄積した。しかし反応時間をのばすと生成蓄積した5'-イノシン酸の分解による減少が認められた。

【0092】実施例11 (ヌクレオチダーゼ活性低下型の酸性フォスファターゼ遺伝子の作成)

50 実施例9及び10に示したように酸性フォスファターゼ

(12)

特開平9-37785

21

適任子保持株は着色の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロリン酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5'-イノシン酸が生成蓄積する。しかし、生成した5'-イノシン酸が酸性フォスファターゼ自体が有するヌクレオチダーゼ活性によって分解を受けるために5'-イノシン酸の蓄積量がある程度以上は上がらないことが判明した。そこで実施例7にてクローニングしたモルガナ・モルガニ NCIMB 10466由来酸性フォスファターゼ遺伝子にPCRを用いる部位特異的変異法により変異を導入し、酵素の改質を行った。

【0093】DNA合成装置（アプライドバイオシステム社製モデル 394）を用いてホスホアミダイト法にて配列表記番号5、6及び7に示す配列を有するオリゴヌクレオチドMUT500、MUT510及びMUT520をそれぞれ合成した。

【0094】鋳型として実施例8で調製したプラスミドpMPI505を1ng、プライマーとしてM13プライマーRV（宝酒造社製）とMUT510オリゴヌクレオチド各2.5 μmol及びタックDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μM、塩化カリウム50mM及び塩化マグネシウム1.5mMを含む100mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.3）100 μLに添加し、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを25回繰り返すPCR反応を行った。PCR反応はサーマルサイクラーPJ2600型（宝酒造社製）を用いて行った。また別に、鋳型としてプラスミドDNA pMPI505を1ng、プライマーとしてM13プライマーM4（宝酒造社製）とMUT500オリゴヌクレオチド各2.5 μmolを用いて同様にPCR反応を行った。それぞれの反応液をマイクロスピナラム5-400（ファルマシア社製）を用いてゲル濾過により精製し、プライマーを除去した。

【0095】それぞれのPCR反応液1 μLをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μM、塩化カリウム50mM及び塩化マグネシウム1.5mMを含む100mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.3）95 μLに添加し、94℃で10分加熱後、60分間かけて37℃まで冷却した後、37℃で15分保温しヘテロ二本鎖を形成させた。これに、タックDNAポリメラーゼ2.5ユニットを添加して72℃で3分反応を行い、ヘテロ二本鎖を完成させた。次に、この反応液にM13プライマーRV及びM13プライマーM4各2.5 μmolを添加して、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを10回繰り返すPCR反応を行った。

【0096】2回目のPCR反応の生成物をHind IIIとEcoRIで切断後、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このDNA断片をHind III及びEcoRIで切断したpUC118に結合し、得られたプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造製）を形質転換した。これを100 μg/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地上にプレーティン

22

グし、形質転換体を得た。

【0097】形質転換体よりアルカリ溶菌法によってプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。塩基配列の決定は、TaqDye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオケミカル社製）を使用し、サンガーらの方法（J. Mol. Biol., 143, 151, 1980）に従って行った。このようにして成熟蛋白質の72番目のグリシン残基（GGT）がアスパラギン酸残基（GAT）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpMPI510と命名した。

【0098】また、鋳型としてpMPI505、プライマーとしてMUT500とMUT520オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の151番目のイソロイシン残基（ATC）がスレオニン残基（ACC）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpMPI520と命名した。

【0099】さらに鋳型としてpMPI510、プライマーとしてMUT500とMUT520オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の72番目のグリシン残基（GGT）がアスパラギン酸残基（GAT）に、151番目のイソロイシン残基（ATC）がスレオニン残基（ACC）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpMPI530と命名した。

【0100】それぞれの変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI510、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI520、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI530及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505を、アンピシリン100 μg/mLおよびIPTG 1 mMを含むLB培地に50 mLに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5 mLの100mM 燐酸バッファー（pH7.0）に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破砕した。処理液を遠心分離して不溶性固分を除き、無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液のヌクレオチダーゼ活性を測定し、野生株のものと比較した。

【0101】部位特異的変異法により作製した変異型酸性フォスファターゼの各々の変異点のアミノ酸変異と塩基置換及びヌクレオチダーゼ活性を野生型酵素の活性に対する相対活性で表した結果を表8に示す。作製した変異型酸性フォスファターゼはいずれも野生型酸性フォスファターゼに比べてヌクレオチダーゼ活性が低下していた。

【0102】

【表8】

(13)

特開平9-37785

23

プラスミド	変異点及びアミノ酸変換	ヌクレオチダーゼ活性
pMPI505	野生型	100
pMPI510	<sup>151</sup> Gly (GGT) → Asp (G <sup>+</sup> AT)	10
pMPI520	<sup>151</sup> Ile (ATC) → Thr (A <sup>+</sup> CC)	36
pMPI530	<sup>151</sup> Gly (GGT) → Asp (G <sup>+</sup> AT) <sup>151</sup> Ile (ATC) → Thr (A <sup>+</sup> CC)	18

24

【0103】実施例12（ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産）

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI510、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI520、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI530 及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505 をアンピシリン100  $\mu$ g/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50mLに接種し、37°Cで16時間培養した。

【0104】ヒロ燐酸ナトリウム12g/dL及びイノシン6g/dLを100mM酢酸バッファー（pH4.0）に溶解し、これに上記の培養で得たエシェリヒア・コリ各菌株の菌体を乾燥菌体重量で100 mg/dL となるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30°Cで22時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。結果を図5に示す。

【0105】図5中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度（mg/dL）を、横軸は反応時間（hr）を、また黒埋め円形はエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）JM109/pMPI505、黒埋め三角形はエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）JM109/pMPI510、白抜き円形はエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）JM109/pMPI520、白抜き四角形はエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）JM109/pMPI530の各菌株を使用した場合における反応の推移を示す。

【0106】ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産反応においては生成した5'-イノシン酸の分解速度が低下しており、その結果として5'-イノシン酸の収率及び蓄積量が向上した。72番目のグリシン残基及び151番目のイソロイシン残基がそれぞれアスパラギン酸残基及びスレオニン残基へと置換された変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株エシェリヒア・コリ JM109/pMPI530 が最も高い5'-イノシン酸の蓄積を示した。

【0107】実施例13（ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの生産）  
変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI530 をアンピ

シリン100  $\mu$ g/mL及びIPTG 1mMを含むL培地50mLに接種し、37°Cで16時間培養した。

【0108】ヒロ燐酸ナトリウム12g/dL及び燐酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン6g/dLを100mM酢酸バッファー（pH4.5）に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で100 mg/dL となるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30°Cで22時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-燐酸エステルの量を表9に示した。なお、生成したヌクレオシドはヌクレオシド-5'-燐酸エステルのみでヌクレオシド-2'-燐酸エステル及びヌクレオシド-3'-燐酸エステルの副生は全く認められなかった。

【0109】

【表9】

ヌクレオシド	生成物	生成量（g/dL）
イノシン	5'-イノシン酸	10.01
グアノシン	5'-グアニル酸	6.72
ウリジン	5'-ウリジル酸	11.90
シトシン	5'-シチジル酸	7.82

【0110】実施例14（ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種燐酸化物を燐酸供与体とする5'-イノシン酸の生産）

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI530 をアンピシリン100  $\mu$ g/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50mLに接種し、37°Cで16時間培養した。

【0111】イノシン6g/dL及び燐酸供与体としてトリポリ燐酸、ポリ燐酸ナトリウム（商品名：ポリゴンP、千代田化学株式会社製品）、フェニル酢酸シナトリウム又はカルバミル燐酸シナトリウム10g/dLを酢酸バッファー（pH4.5）に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で100 mg/dLとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら30°Cで22時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表10に示した。いずれの燐酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ燐酸を燐酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0112】

【表10】

(14)

特開平9-37785

25

塩基供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dL)
トリポリ磷酸ナトリウム	8.93
ポリ磷酸ナトリウム	11.45
フェニル酢酸シナトリウム	9.62
カルバミル磷酸シナトリウム	9.89

26

【0113】実施例15（エシェリヒア・ブラッタエ染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離）

（1）N末端アミノ酸配列の決定

エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 の無細胞抽出液から精製された酸性フォスファターゼをDITCメンブレン（ミリジェン/バイオサーチ社製）に吸着させ、Prosequencer 5625（ミリジェン/バイオサーチ社製）を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。配列表配列番号8に示す19残基のN末端アミノ酸配列が決定された。

【0114】（2）酸性フォスファターゼをコードする遺伝子断片の単離

エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 の培養菌体からMurray and Thomsonの方法（Nucl. Acid Res., 4321, 8, 1980）に従い、染色体DNAを調製した。これをS<sub>1</sub>AlIで部分分解した後、ショ糖密度勾配遠心分離により3～6 kbpのDNA断片を分離した。プラスミドベクターpUC118（宝酒造社製）をB<sub>am</sub>HIで切断し、部分分解した染色体DNA断片と連結させた。DNAの連結はDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用い、指定された方法にて行った。次いで、得られたDNA混合物を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造社製）を形質転換した。形質転換体をアンピシリン100 μg/mLを含むL寒天培地上にプレーティングして生育させ、遺伝子ライブラリーを作成した。

【0115】形質転換体の生育した寒天培地の表面に4 mMのp-ニトロフェニル磷酸及び100 mMのMES/NaOHバッファー（pH5.5）を含む反応液を注ぎ、30℃で15分間保温した。フォスファターゼ活性を発現した菌は、p-ニトロフェノールを遊離して黄色を示すため、これを指標として、形質転換体を選択した。約8,000 株の形質転換体の染色体遺伝子発現ライブラリーを探索した結果、フォスファターゼ活性を発現した形質転換体14株が得られた。

【0116】フォスファターゼ活性を発現した14株の形質転換体を単コロニー分離し、アンピシリン100 μg/mLを含むL培地2.5mLに接種し、37℃で16時間培養した。培養液から集菌した菌体にイノシン2 g/dl及びピロ磷酸ナトリウム10g/dlを含む100mM 酢酸ナトリウムバッファー（pH5.0）50μLを添加し、30℃ 15 時間反応を行った。HPLC分析にて5'-イノシン酸の生成を検出し、磷酸転移活性を持つ菌株を選択した。その結果、磷酸転移活性を示し、目的の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると予想される形質転換体3株を得ること

ができた。

【0117】実施例16（エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 由来酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列の決定）

実施例15で得られたエシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650由来酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpEPI301と命名した。決定した挿入されたDNA断片の制限酵素地図を図6に示す。

【0118】さらにサブクローニングにより酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素C<sub>1</sub>aIとB<sub>am</sub>HIで切り出される2.4kbpの大きさの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のために該断片をC<sub>1</sub>aI及びB<sub>am</sub>HIで切断したpBluescript KS(+)（ストラテジーン社製）に結合したプラスミドDNAを構築した。pEPI305と命名されたこのプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造社製）を形質転換し、これをアンピシリン100 μg/mLを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

【0119】pEPI305を保有するエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造社製）の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号9に示した。この塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号10に示す。このアミノ酸配列中に精製酵素のN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した。精製酵素のN末端は配列表配列番号10の配列の19番目のロイシン残基から開始していたため、1番目のメチオニン残基から18番目のアラニン残基までのペプチドは翻訳後に除去されるものと考えられた。これより推定される成熟蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号11に示した。これより予想される成熟蛋白質の分子量は25.1キログルトンと算出され、精製酵素SDS-PAGEの結果とよく一致した。以上の結果及び本断片を含むプラスミドを有する形質転換体が磷酸転移活性を示すことから本オープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼをコードする領域であると同定した。

【0120】すなわち、配列表番号11に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 の酸性フォスファターゼ



(15)

特開平9-37785

27

遺伝子である。

【0121】塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との同源性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列番号8に示される蛋白質及びそれをコードするDNAは新規であることが判明した。本遺伝子のコードする前駆体蛋白質は249個のアミノ酸から成り、その配列から予想される蛋白質の分子量は27.0キロダルトンであった。

【0122】アミノ酸配列各々について既知の配列との同源性比較を行った結果、本蛋白質はプロビデンシア・スチュアティ (*Providencia stuartii*) の酸性フォスファターゼと77.4%、実施例8のモルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) の酸性フォスファターゼと77.1%、サルモネラ・チヒムリウム (*Salmonella typhimurium*) の酸性フォスファターゼと44.3%の同源性を示した。

【0123】なお、pEPI305 をエシェリヒア・コリ JM109 に保持させた株は、AJ1144 と命名され、ブタベスト条約に基づく国際寄託機関である日本国茨城県に所在の道南産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に1996年2月23日付で既に寄託され、その受託番号FERM B-542が付与されている。

【0124】実施例17 (エシェリヒア・ブラッタエ JM

28

\* JM1550 由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の発現による活性の増幅)

実施例16で作成したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305 を、アンピシリン100 µg/mlおよびIPTG 1mMを含む培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM 燐酸バッファー (pH7.0) に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破砕した。処理液を遠心分離して不溶性成分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0125】得られた無細胞抽出液の燐酸転移活性を、プラスミドpBluescript KS (+) で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109及びエシェリヒア・ブラッタエ野生株より調製した無細胞抽出液を対照として測定した結果を表1に示す。エシェリヒア・コリ JM109/pBluescript KS (+) では燐酸転移活性は検出されず、エシェリヒア・ブラッタエ野生株でも燐酸転移活性は低かった。一方、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI305 はエシェリヒア・ブラッタエ野生株に比べて比活性で120倍と高い燐酸転移活性を示しており、この結果から導入したDNA断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

【0126】

【表1】

菌株	酵素活性 (units/mg)
エシェリヒア・ブラッタエ JCM1550	0.002
エシェリヒア・コリ JM109/pBluescript KS (+)	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pEPI305	0.264

【0127】実施例18 (エシェリヒア・ブラッタエ JM1550 由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産)

ピロ燐酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6g/dlを100mM 燐酸バッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記のエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305 の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で10時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図7に示す。図7中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度(mg/dl)を、横軸は反応時間(hr)を、また黒埋め円形は反応の推移を示す。本菌を用いたピロ燐酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5'-イノシン酸が生成蓄積した。

【0128】実施例19 (ヌクレオチダーゼ活性低下型の酸性フォスファターゼ遺伝子の作成)

実施例17および18に示したように、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は善置の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロ

燐酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5'-イノシン酸が生成蓄積する。しかし、生成した5'-イノシン酸が、酸性フォスファターゼ自体が有するヌクレオチダーゼ活性によって分解を受けるため、5'-イノシン酸の蓄積量がある程度以上は上昇しないことが判明した。そこで実施例15にてクローニングしたエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子にPCRを用いる部位特異的変異法により変異を導入し酵素の性質の改良を行うこととした。

【0129】DNA合成装置 (アプライドバイオシステム社製モデル394) を用いてホスホアミダイト法にて配列表配列番号12、13及び14に示すオリゴヌクレオチドMUT300、MUT310及びMUT320をそれぞれ合成した。

【0130】鋳型として実施例16で調製したプラスミドpEPI305 1ng、プライマーとしてM13プライマー-RV (宝酒造社製) 及びMUT310オリゴヌクレオチド各2.5 µmol及びタックDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5 ユニットを、dATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 µM、塩化カリウム 50mM及び塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.3) 100µL に添加し、94℃

(15)

特開平9-37785

29

を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを25回繰り返すPCR反応を行った。PCR反応はサーマルサイクラーPJ2000型（宝酒造社製）を用いて行った。また別に、鋳型としてプラスミドpEPI305 1ng プライマーとしてM13プライマーM3（宝酒造社製）及びMJT305オリゴヌクレオチド各2.5 μmolを用いて同様にPCR反応を行った。それぞれの反応液をマイクロスピニングカラム S-400（ファルマシア社製）を用いてゲル濾過により精製し、プライマーを除去した。

【0131】それぞれのPCR反応液1 μLを、dATP、dCTP、dGTP、dTTP各305 μM、塩化カリウム 50mM および塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.3）95 μLに添加し、94℃で10分加熱後、60分間かけて37℃まで冷却したのち、37℃で15分保温し、ヘテロ二本鎖を形成させた。これにタックDNAポリメラーゼ2.5 ユニットを添加して72℃で3分間反応を行い、ヘテロ二本鎖を完成させた。次に、この反応液にM13プライマーRV及びM13プライマーM3 各2.5 μmolを添加して、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを10回繰り返すPCR反応を行った。

【0132】2回目のPCR反応の生成物をC1a1とBa m H1で切断後フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このDNA断片をC1a1とBa m H1で切断したpBluescript KS (+)に結合し、得られたプラスミドDNAを用いて高法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造製）を形質転換した。これを100 μg/mLのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

【0133】形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。このようにして成熟蛋白質の74番目のグリシン残基（GGG）がアスパラギン酸残基（GAT）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI310と命名した。

【0134】鋳型としてpEPI305、プライマーとしてMJT

30

\* T300とMJT320オリゴヌクレオチドを用い、同様の操作により成熟蛋白質の153番目のイソロイシン残基（ATC）がスレオニン残基（ATC）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI320と命名した。

【0135】さらに鋳型としてpEPI310、プライマーとしてMJT300とMJT320オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の74番目のグリシン残基（GGG）がアスパラギン酸残基（GAT）に、153番目のイソロイシン残基（ATC）がスレオニン残基（ATC）に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI330と命名した。

【0136】それぞれの変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI310、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI320、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 μg/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50 mLに接種し、37℃で16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5 mLの10 mM 磷酸バッファー（pH7.0）に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い破砕した。

【0137】処理液を遠心分離して不溶性成分を除き、無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液のヌクレオチダーゼ活性を測定し、野生株のものと比較した。

【0138】部位特異的変異法により作製した変異型酸性フォスファターゼの各々の変異点のアミノ酸置換と塩基置換及びヌクレオチダーゼ活性を野生型酵素の活性に対する相対活性で表した結果を表12に示す。作製した変異型酸性フォスファターゼはいずれも野生型酸性フォスファターゼに比べてヌクレオチダーゼ活性が低下していた。

【0139】

【表12】

プラスミド	変異点およびアミノ酸置換	ヌクレオチダーゼ活性
pEPI305	野生型	100
pEPI310	Gly (GGG) → Asp (GAT)	11
pEPI320	Ile (ATC) → Thr (ATC)	38
pEPI330	Gly (GGG) → Asp (GAT) Ile (ATC) → Thr (ATC)	18

【0140】実施例20（ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産）

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI310、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI320、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含む

プラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305を、アンピシリン100 μg/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50 mLに接種し、37℃で16時間培養した。

【0141】ピロリン酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6 g/dlを酢酸バッファー（pH4.0）に溶解し、これに上記培養で得たエシェリヒア・コリ各菌株の菌体を乾燥菌体当量で250mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しな

(17)

特開平9-37785

31

から、35℃で32時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。結果を図8に示す。

【0142】図8中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度(mg/dL)を、横軸は反応時間(hr)を、また黒埋め円形はエシェリヒア・コリ(Escherichia coli) JM109/pEPI305、黒埋め三角形はエシェリヒア・コリ(Escherichia coli) JM109/pEPI310、白抜き円形はエシェリヒア・コリ(Escherichia coli) JM109/pEPI320、白抜き四角形はエシェリヒア・コリ(Escherichia coli) JM109/pEPI330の各菌株を使用した場合における反応の推移を示す。

【0143】ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産反応においては生成した5'-イノシン酸の分解速度が低下しており、その結果として5'-イノシン酸の収率及び蓄積量が向上した。74番目のグリシン残基及び153番目のイソロイシン残基がそれぞれアスパラギン酸残基及びスレオニン残基へと置換された変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330 が最も高い5'-イノシン酸の蓄積を示した。

【0144】実施例21(ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの生産)変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI330 をアンピシリン100 µg/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50mLに接種し、37℃で16時間培養した。

【0145】ピロ燐酸ナトリウム12g/dL及び燐酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン6g/dLを100mM 酢酸バッファー(pH4.5)に溶解し、これに上記の菌株を乾燥菌体重量で200 mg/dL となるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で32時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-燐酸エステルの量を\*

燐酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dL)
トリポリ燐酸ナトリウム	5.96
ポリ燐酸ナトリウム	8.84
フェニル酢酸シナトリウム	7.60
カルバミル燐酸シナトリウム	7.73

【0150】

【発明の効果】本発明は、酸性フォスファターゼをpH3.0~5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリ燐酸(塩)、フェニル燐酸(塩)及びカルバミル燐酸(塩)からなる群より選択される燐酸供与体に作用させることにより、安価かつ効率よくヌクレオシド-5'-燐酸エステルを製造することができると云う効果を有する。

【配列表】

配列番号: 1

配列

Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr

32

\*表13に示す。なお、生成したヌクレオシドはヌクレオシド-5'-燐酸エステルのみでヌクレオシド-2'-燐酸エステル及びヌクレオシド-3'-燐酸エステルの副生は全く認められなかった。

【0146】

【表13】

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dL)
イノシン	5'-イノシン酸	7.45
グアノシン	5'-グアニル酸	4.77
ウリジン	5'-ウリジル酸	8.93
シチジン	5'-シチジル酸	6.60

10

【0147】実施例22(ヌクレオチダーゼ活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いる各種燐酸化化合物を燐酸供与体とする5'-イノシン酸の生産)変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI330 を、アンピシリン100 µg/mL及びIPTG 1 mMを含むL培地50mLに接種し、37℃で16時間培養した。

20 【0148】イノシン6g/dLと、燐酸供与体としてトリポリ燐酸、ポリ燐酸ナトリウム(商品名:ポリゴンP、千代田化学株式会社製品)、フェニル酢酸シナトリウムまたはカルバミル燐酸シナトリウム12g/dLとを100mM 酢酸バッファー(pH4.0)に溶解し、これに上記の菌株を乾燥菌体重量で200mg/dLとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で32時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表14に示す。いずれの燐酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ燐酸を燐酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0149】

【表14】

40※配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の相類: 蛋白質

フラグメント型: N末端フラグメント

起源

生物名: モルガネラ・モルガニ(Morganella morganii)

※ 株名: NCIM 10466

			(18)		特開平9-37785
	33				34
	1	5	10	15	
	Leu Lys Asn Glu				
		20			
配列番号: 2					* 生物名: モルガネラ・モルガニ (Morganelle morгани)
配列の長さ: 747					)
配列の型: 核酸					株名: NCIMB 10466
鎖の数: 二本鎖					配列の特徴
トポロジー: 直鎖状					特徴を表す記号: C D S
配列の種類: Genomic DNA					存在位置: 1..747
起源:					* 10 特徴を決定した方法: E

序列	
ATGAAGAAGA ATATTATCGC CGGTGTGCTG TTCTCACTGT TTTCCTTTC CGCGCTGGCC	60
CGGATCGCGG CGGGCAACGA TGCCACCACC AAGCCGGATT TATATTATCT GAAAAATGAA	120
CAGGCTATCG ACAGGCTGAA ACTGTTACGG CCACCGCCGG AAGTCGGCAG TATTCAGTTT	180
TAAATGATC AGGCAATGTA TGAAGAAAGC CGTATGCTCC GCAATACCGA CGCGCGAAAA	240
CAGGCACAGG CAGATGCTGA CCTGCGCCGA GCGGGTGTGG CAACCGCATT TTCAGGGCCA	300
TTCCGGCTAT CGATAACCGA AAAAGACTCT CCGGAGCTGT ATAACTGCT GACCAATATG	360
ATTGAGGATG CCGGTGATCT TGCCACCCGC TCGCGCAAAG AACATTACAT CGGCATCCGG	420
CGGTTTCGGT TTTAACGGCAC AGAAACCTGT AATACCAAAG ATCAGAAAAA ACTCTCCACC	480
AACGGATCTT ACCCGTCAGG TCATACGTTT ATGGGCTGGG CAACCGCACT GGTGCTGGCG	540
GAAGTGAACC CGGCAAAATCA GGATCGGATT CTGGAACCGG GTTATCAGCT CGGACAGAGC	600
CGGGTGATTT CGCGCTATCA CTGGCAGAGT GATGTGGATG CCGCGCGGAT TGTGGGTTCA	660
CGCGCTGTGG CGACATTACA TTCCGATCGG GCATTTGAGG CGCAGTTAGC GAAAGCCAAA	720
CAGGAATTTG CACAAAAATC ACACAAA	747

配列番号: 3	※ 起源
配列の長さ: 249	生物名: モルガネラ・モルガニ ( <i>Morganella morganii</i> )
配列の型: アミノ酸	)
トポロジー: 直鎖状	株名: NCIMB 10466
配列の種類: 蛋白質	※

<b>配列</b>																	
Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ile	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Ser	Leu	Phe	Ser	Leu		
-20					-15					-10						-5	
Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro		
				1				5					10				
Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Lys	Leu		
		15					20					25					
Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln		
	30					35					40						
Ala	Met	Tyr	Glu	Lys	Gly	Arg	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Glu	Arg	Gly	Lys		
45				50						55					60		
Gln	Ala	Gln	Ala	Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Ala		
				65					70					75			
Phe	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Pro	Glu		
			80					85					90				
Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala		
		95					100					105					
Thr	Arg	Ser	Ala	Lys	Glu	His	Tyr	Met	Arg	Ile	Arg	Pro	Phe	Ala	Phe		
	110					115					120						
Tyr	Gly	Thr	Glu	Thr	Cys	Asn	Thr	Lys	Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Ser	Thr		
125				130						135					140		

(19)

特開平9-37785

35 36  
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala  
 145 150 155  
 Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu  
 160 165 170  
 Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp  
 175 180 185  
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala  
 190 195 200  
 Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys  
 205 210 215 220  
 Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys  
 225 229

配列番号: 4

配列の長さ: 229

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種別: 蛋白質

\* 起源

生物名: モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)

株名: NCIMB 10466

\*

配列

Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu Leu Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met Tyr Glu  
 35 40 45  
 Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Gln Ala Gln Ala  
 50 55 60  
 Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala Phe Ser Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu Leu Tyr Lys Leu  
 85 90 95  
 Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala  
 100 105 110  
 Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly Thr Glu  
 115 120 125  
 Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr Asn Gly Ser Tyr  
 130 135 140  
 Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu Arg Gly Tyr Gln  
 165 170 175  
 Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val  
 180 185 190  
 Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala Thr Leu His Ser  
 195 200 205  
 Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Glu Phe Ala  
 210 215 220  
 Gln Lys Ser Gln Lys  
 225 229

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

50 鎖の数: 一本鎖

<p>トポロジ：直鎖状 配列の種類：他の核酸 合成DNA 配列 ATTACCATGA TTACGAATTC 20 配列番号：6 配列の長さ：21 配列の型：核酸 鎖の数：一本鎖 トポロジ：直鎖状 配列の種類：他の核酸 合成DNA 配列 GCGGTGCCA CATGCCCTGC G 21 配列番号：7 配列の長さ：21 配列の型：核酸</p>	(20) 特開平9-37785	<p>38 * 鎖の数：一本鎖 トポロジ：直鎖状 配列の種類：他の核酸 合成DNA 配列 TTGCCAGCC GGTAGACGTA T 21 配列番号：8 配列の長さ：15 配列の型：アミノ酸 トポロジ：直鎖状 10 配列の種類：蛋白質 フラグメント型：N末端フラグメント 起源 生物名：エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae) * 株名：JCM 1650</p>
<p>配列 Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu 1 5 10 15 配列番号：9 配列の長さ：747 配列の型：核酸 鎖の数：二本鎖 トポロジ：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA 起源</p>	<p>* 生物名：エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae) 株名：JCM 1650 配列の特徴 特徴を表す記号：C D S 存在位置：1..747 ※ 特徴を決定した方法：E</p>	
<p>配列 ATGAAAAAC GTGTTCTGCC AGTTTGTITT GCGGCATTGT TCTCTTCTCA GCGCCTGGCG 60 CTGGTGGCTA CCGGCAACGA CACTACCAGG AAACCGGATC TCTACTACCT CAAGAACAGT 120 GAAGCCATTA ACAGCCTGCC GCTGTTCGGG CCACCACCGG CGGTGGCTC CATTGGGTTT 180 CTCAAGGATC AGCCCATGTA TGAACAGCGG CGCTGCTGC GCAACACCGA AGCGCGTAAG 240 CTGGCGCGCG AAGATGCAAA CCTGAGCAGT GCGCGGGTGG CGAATGCTTT CTCGGGCGCG 300 TTTGGTAGCC CGATCACCGA AAAAGACCGC CCGCGCTGCG ATAAATTACT GACCAATATG 360 ATTGAGGAGC CCGGGATCT GCGGACCGC AGCGCGAAG ATCACTATAT GCGCATTCTG 420 CGGTTCGGT TTTATGGGT CTCTACCTGT AATACCACCG AGCAGGACAA ACTGTGCAAA 480 AATGGCTCTT ATCGGTCGGG GCATACCTCT ATCGGCTGGG CTACTGGCT GGTGCTGGCA 540 GAGATCAACC CTCAGGGCCA GAACGAGATC CTGAAACCGG GTTATGAGCT GCGCCAGAGC 600 GCGGTGATTT GCGGTACCA CTGCGAGAGT GATGTGATG CCGCGCGGT AGTGGGATCT 660 GCGTTGTGG CGACCTGCA TACCAACCGG GCGTTCAGC AGCAGTTGCA GAAAGCGAAG 720 GCGGAATTCG CCGACATCA GAAGAAA 747</p>	<p>40★起源 生物名：エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae) 株名：JCM 1650</p>	
<p>配列番号：10 配列の長さ：249 配列の型：アミノ酸 トポロジ：直鎖状 配列の種類：蛋白質</p>	<p>★</p>	
<p>配列 Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Val Cys Phe Ala Ala Leu Phe Ser Ser -18 -15 -10 -5 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro 1 5 10 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu</p>		

(21)

特開平9-37785

39 20 25 30 40  
 15 Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln  
 35 40 45  
 Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys  
 50 55 60  
 Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala  
 65 70 75  
 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala  
 80 85 90  
 Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala  
 95 100 105 110  
 Thr Arg Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe  
 115 120 125  
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys  
 130 135 140  
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala  
 145 150 155  
 Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys  
 160 165 170  
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp  
 175 180 185 190  
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala  
 195 200 205  
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys  
 210 215 220  
 Ala Glu Phe Ala Gln His Gln Lys Lys  
 225 230

配列番号: 11

配列の長さ: 231

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

\* 起源

生物名: エシエリヒア・ブラッタエ (Escherichia blat

30 xae)

株名: JOM 1650

\*

配列

Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu Leu Pro  
 20 25 30  
 Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met  
 35 40 45  
 Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Leu Ala  
 50 55 60  
 Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala Leu His  
 85 90 95  
 Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg  
 100 105 110  
 Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly  
 115 120 125  
 Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys Asn Gly

(22)

特開平9-37785

41 42

135 135 140

Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val

145 150 155 160

Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys Arg Gly

165 170 175

Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser

180 185 190

Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala Thr Leu

195 200 205

His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys Ala Glu

210 215 220

Phe Ala Gln His Gln Lys Lys

225 230

配列番号: 1 2

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種別: 他の核酸 合成DNA

配列

CCTCGAGTC GACGGTATCG 20

配列番号: 1 3

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種別: 他の核酸 合成DNA

配列

ATTGGCCACA TCGCCACTGC T 21

配列番号: 1 4

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種別: 他の核酸 合成DNA

配列

TAGCCGAGCC GGTACAGCTA TG 22

【図面の簡単な説明】

【図1】モルガネラ・モルガニ由来の酵素を用いた反応\*

\*において反応pHと5'-イノシン酸生成量との関係を示す図である。

【図2】エシェリヒア・ブラッカエ由来の酵素を用いた反応において反応pHと5'-イノシン酸生成量との関係を示す図である。

【図3】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むモルガネラ・モルガニの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

【図4】モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

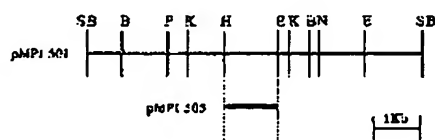
【図5】モルガネラ・モルガニ由来の野生型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株及び変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

【図6】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むエシェリヒア・ブラッカエの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

【図7】エシェリヒア・ブラッカエ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

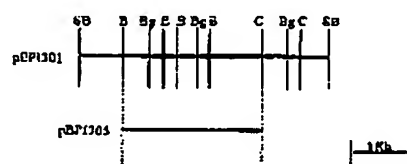
【図8】エシェリヒア・ブラッカエ由来の野生型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株及び変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

【図3】



SB: SmaI / BamHI junction B: BamHI E: EcoRI K: KpnI  
H: HindIII N: NcoI P: PstI

【図6】



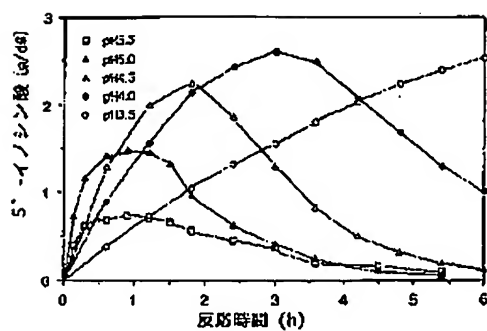
SB: SmaI / BamHI junction B: BamHI B: BamHI E: EcoRI C: ClaI



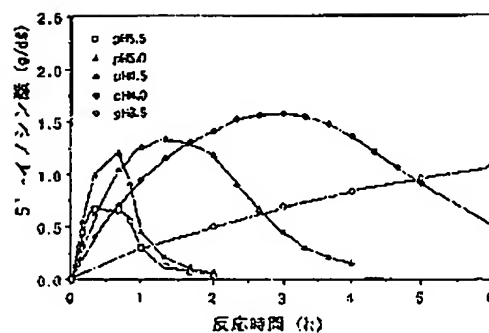
(23)

特開平9-37785

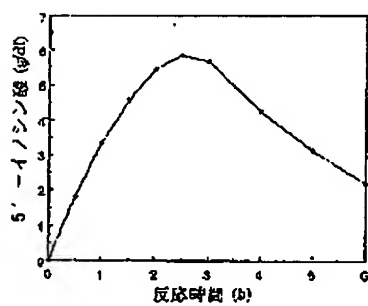
【図1】



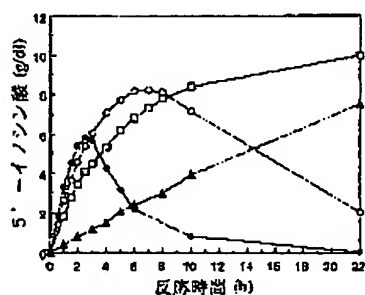
【図2】



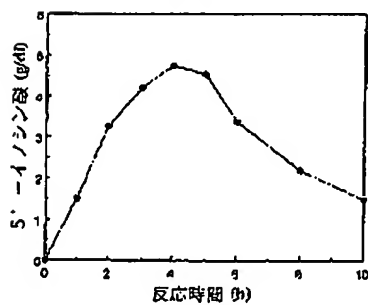
【図4】



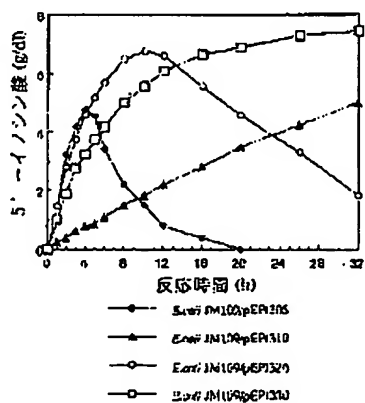
【図5】



【図7】



【図8】



(24)

特開平9-37785

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
(C 1 2 N 9/16				
C 1 2 R 1:01)				

(72)発明者 浅野 泰久  
富山県射水郡小杉町太閤山9-3-1-  
321